

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22591

研究課題名（和文）Cell-basedハイコンテンツイメージングとAIの融合による創薬基盤の創出

研究課題名（英文）Development of Drug Discovery Platform by Cell-based High Content Imaging for psychiatric disorders

研究代表者

高木 朗子（林朗子）（Hayashi-Takagi, Akiko）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：60415271

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：人類遺伝学的所見や各種脳画像所見は、シナプスの障害による神経回路の変容が精神疾患の重要な病態生理であり、シナプス障害を緩和するという新規の戦略の有用性が示唆され始めている。一方で、このような治療戦略に立脚した創薬は行われていないため、本申請では96穴プレート上でハイスループットにシナプス密度を定量し、シナプス保護効果を有する化合物をスクリーニングした。病態モデルとしてはフェンサイクリジン（PCP）投与モデルを、ライブラリーは東京大学創薬機構の既知活性物質ライブラリー（1280化合物）を用い、幾つかのヒット化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法は、特定の分子に注目することなくCell-basedな表現型スクリーニングを用いることで、細胞ストレス応答の代謝系をロバストに制御する化合物を見出すことが期待できる。ヒット化合物のDrug repositioning、またはヒット化合物を基にした新規の“リード化合物”の第一歩となれば価値のある基礎研究と思われる。また、本申請はDeep learningを用いた自動画像撮像および解析技術の創出であり、手解析を自動識別のシステムに置き換えることにより、大きなパラメータ空間を現実的にスクリーニングできるようになる。この技術が確立した暁には、他の様々な創薬研究に展開することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Postmortem brain research and various brain imaging findings have suggested that the alteration of neural circuits due to synaptopathy is an important pathophysiology of psychiatric disorders and that novel strategies to alleviate synaptopathy can be useful. In this application, we screened for compounds with synaptic protective effects by quantifying synaptic density by a 96-well plate-based high content imaging. We used a phencyclidine (PCP) model as a pathological model and LOPAC1280 library, and found several hit compounds, which have prevented the PCP-induced synaptopathy.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 糖化ストレス フェンサイクリジン ドラッグスクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

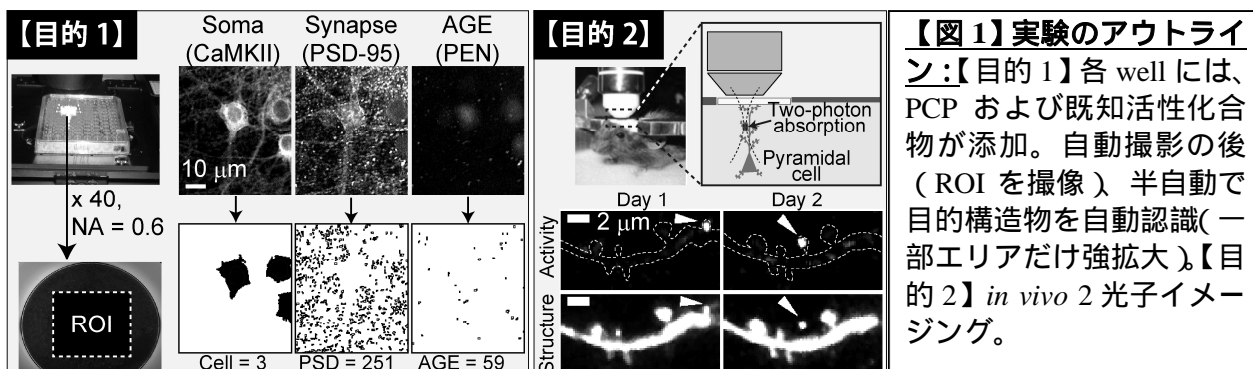
抗精神病薬は病因に立脚して理論的に合成されたのではなく、偶然の産物である。現在にでも、病因に立脚した抗精神病薬は皆無であり、その治療効果は不十分である。申請者は精神科臨床業務に8年間(常勤2年、非常勤6年)携わる中で、この事実を肌で感じ、衝撃を受けた。そこで精神科専門医の取得と並行し、統合失調症の病態に関する基礎研究へ軸足をシフトさせた。脳の機能を理解する際に、シナプスが重要であることは疑いの余地がなく Hayashi-Takagi *et al*, 2015, *Nature*) 統合失調症の死後脳や動物モデルでシナプスの減少が報告されている。未服薬の統合失調症初発例においてグルタミン酸受容体結合能の低下が前頭野で見られ、この受容体結合能は臨床症状と相関がある (Pilowsky *et al*, 2006, *Mol Psychi*)。したがって、統合失調症においてシナプトパッチが責任的役割の少なくとも一部を担うことは正しいと思われる。実際に、申請者は、DISC1 という統合失調症関連遺伝子のノックダウンマウスでは発達後期にシナプスの密度が大きく減少すること (Hayashi-Takagi *et al*, 2010, *Nat Neurosci*) シナプス減少を予防する低分子化合物は統合失調症様行動異常も部分的に予防できることを見出した (Hayashi-Takagi *et al*, 2014, *Proc Natl Acad Sci USA*)。次に生じる疑問は、シナプトパッチの分子細胞メカニズムである。シナプスではシナプス入力を受けることに NADPH オキシダーゼ (NOX) などの活性化が生じ酸化ストレスが生じること、酸化ストレスは糖化ストレスを誘発することが知られている。そこで、申請者は、大脳皮質のシナプスこそ各種細胞応答ストレスが神経回路異常とリンクする座であり、同代謝産物をシナプスレベルの解像度でイメージングし、疾患関連代謝産物を減少させシナプス保護作用を有する化合物を見出したいと考えた。

## 2. 研究の目的

**【目的1】疾患感受性代謝産物に着目した Cell-based な化合物スクリーニングと AI 技術の融合**

**【目的2】in vivo シナプス・細胞応答イメージングと同一個体での行動解析**

ストレス細胞応答とシナプトパッチに着目し、疾患代謝関連産物とシナプトパッチを軽減する化合物を見出すことは、さまざまな精神疾患に対する新規の治療薬として有用と思われる。なぜならば、シナプト障害の原因は単一因子に起因するものではないし、また酸化ストレス産物や終末糖化産物 (AGE) も様々な分子により酵素的・非酵素的に複雑な制御をうけるため、単一の分子に着目したスクリーニングには限界があり、細胞全体の表現型に着目した化合物スクリーニングが今後必要となってくると思われる。しかし細胞の形態や、有害な終末糖化産物 (AGE) がどのような細胞内局在で蓄積するかなどの複雑な画像情報を手動の画像解析で定量することは困難である。そこで、教師ありの Deep learning 手法を用いて、上記の複雑な細胞全体の表現系を自動定量するための、AI 創薬手法の確立を試みる**【目的1】**。in vivo イメージングと行動実験系を併用できる実験系を確立し、候補薬剤の個体レベルでの効果を検証するプラットフォームを確立する**【目的2】**。ヒット化合物の脳血管関門の通過が良い場合は腹腔投与で、そうではない場合は脳内微小循環デバイスを用いて、生体大脳皮質へ安定投与出来る実験



系を確立している。使用するライブラリーは承認薬などを含む既知活性化合物ライブラリーであるため、このようなヒット化合物の個体レベルでの有効性があったとしたら、DR (Drug repositioning)へ展開する可能性、また共同研究のもとで、ヒット化合物を基にした新規の“リード化合物”の創出に挑戦する2つの展開がありうる。

(意義) 本手法は、特定の分子に注目することなく Cell-based な表現型スクリーニングを用いることで、細胞ストレス応答の代謝系をロバストに制御する化合物を見出すことが期待できる。ヒット化合物の Drug repositioning、またはヒット化合物を基にした新規の“リード化合物”の第一歩となれば価値のある基礎研究と思われる。また、本申請は Deep learning を用いた自動化画像撮像および解析技術の創出であり、手解析を自動識別のシステムに置き換えることにより、大きなパラメータ空間を現実的にスクリーニングできるようになる。この技術が確立した暁には、他の様々な創薬研究に展開することが期待される。

### 3. 研究の方法

統合失調症モデルとして確立している慢性フェンサイクリジン (PCP) モデルを、96 well プレート上でハイコンテンツに自動定量する実験系を構築する。PCP 負荷と同時に、東京大学創薬機構の既知活性化合物ライブラリー (1280 化合物) を、1 well に対して 1 化合物ずつ添加し、2 週間培養する。神経細胞の形態 (CaMKII・rabbit IgG)、興奮性シナプス (PSD95・mouse IgG2a)、終末糖化産物 (ペントシジン・mouse IgG1) の 3 色で多重免疫染色し、撮像する。手動解析において良好な培養画像を「良好培養」、手動解析で不健康な培養画像を「不良培養」とし、どちらの画像も数百枚レベルまで数を増やし、教師信号とする。上記の 3 色の局在パターンを学習して、新たに得られた培養画像に対して、「良好培養」であるか「不良培養」であるかを総合的に自動定量できるパラダイムを確立する。これによって、大規模な創薬スクリーニングを実現させることを目指す。Google で開発された TensorFlow というニューラルネットワークのライブラリを元に、Python で画像を自動識別するシステムを構築する。過学習を避けるために試行錯誤する必要が多分にあるが、このパラダイムを基に 1280 化合物の効果を再定量し、シナプトパッチおよび糖化ストレスを軽減する化合物を見出す。はじめは画像解析法に注力するが、このステップが成功したならば、画像撮像のステップも完全に自動化することに挑戦する。画像撮像が完全自動化出来ない律速段階は、適切な細胞密度、且つ Debris が無い視野を選ぶことが現行では自動で出来ないためである。しかし上記の条件も Deep learning により自動識別が可能であり、すなわち画像撮像から解析まで完全に自動化出来た時の効果は大きいとおもわれる。

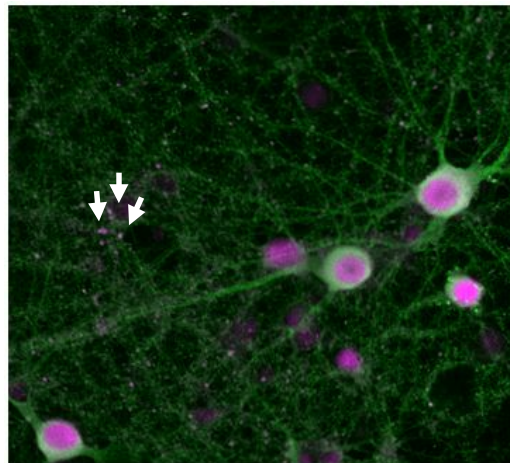
### 4. 研究成果

#### 目的 1、疾患感受性代謝産物に着目した Cell-based な低分子化合物スクリーニング系の確立

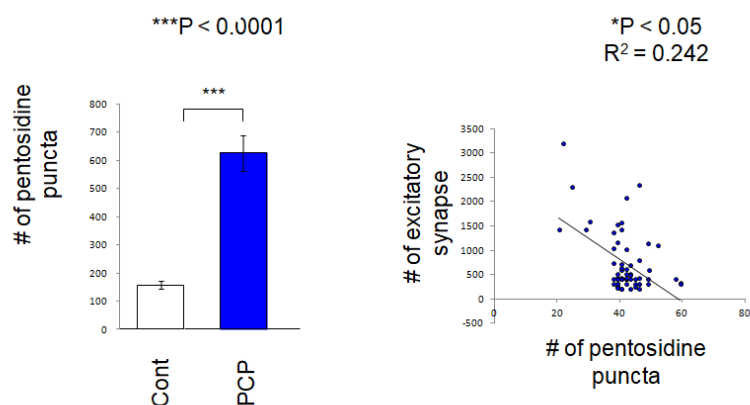
統合失調症の新規候補薬をスクリーニングするためのハイスループット In vitro ラット大脳皮質単離培養系モデル (フェンサイクリジン誘導性のシナプス障害・代謝産物蓄積) については、培地組成の最適化を検討した結果、満足できる系を確立した。興奮性シナプス密度は PSD-95 puncta の数、糖化ストレスは終末糖化産物であるペントシジン puncta の数、酸化ストレスに関しては 4-HNE (脂質過酸化分解物) の産生量を蛍光輝度で近似するイメージング系を確立した。画像解析に関しては、深層学習によって、画像に潜む局在パターンを学習する方法論を構築し、評価した。17,960 枚のサンプル画像を用いて、1 色の微弱なパターン (点源) を学習するアーキテクチャを、まずは単純な例として作った。Sadr et al. 2018 を参考に、画像の微弱な点源のパターンを同定し強調するように GPU を用いて学習させた。具体的には、画像の点源の xyz を予め同定しておき、この位置を中心とするガウス関数で元の画像の点源を enhance した画像データを教師データとした。元の画像から深層学習のモデルにより予測した画像と、教師データの画像の損失を小さくするようにモデルを決定した。全画像の 9 割を訓練用に使い、残りの 1 割で検証が可能になった。これにより、新たな画像を入力したときに、訓練したモデルから

パターンを推定することができる。これらの解析の結果、ペントシジンの蓄積は多くの神経細胞に同程度蓄積するのではなく、蓄積の程度には大きな多様性があること、また蓄積する細胞内局在にも大きな偏りがあり、一部の樹状突起スパインに高輝度で蓄積していることが観察された（**図2**）。神経細胞内にどのようにペントシジンが蓄積するかは今まで報告がなく、興奮性シナプス後部である樹状突起スパインの一部にペントシジンが蓄積していることは、シナプスにおける局所的な糖化ストレスをはじめて示したと言える。また、ペントシジンの蓄積が多いWellほど、Well内の興奮性シナプス数が少ないという負の相関からも（**図2**、下段）、シナプトパッチの一因としての糖化ストレスの関与を示唆している。

このようにハイコンテンツスクリーニングの *in vitro* 系が確立したので、この培養系におけるシナプス障害・代謝産物蓄積に対して保護的な化合物を見出すために、既知活性物質ライブラリーを用いたスクリーニングを開始した。興奮性シナプス数、ペントシジン（終末糖化産物）4-HNE（脂質過酸化分解物）の産生量などを指標として、まずは東京大学創薬機構の既知化合物ライブラリー（1280化合物）の効果を順次検証し1280化合物のスクリーニングが終了した。



**【図2】PCP 処理後のラット大脳皮質初代培養。**  
**緑：興奮性神経細胞マーカーである CaMKII。紫：ペントシジン。**ペントシジンの蓄積は細胞内で様ではなく、ペントシジンが高輝度で蓄積した樹状突起スパイン（矢頭）と、ほとんど全く蓄積していないスパイン（矢印）が観察された。



## 2、*in vivo* ストレスイメージングと同一個体での行動解析

前述した *In vitro* の実験系で得られた化合物の効果は、*in vitro* 系だけで完結するのではなく、必ず *in vivo* レベルで再現することを確認する必要がある。そのためには、個体レベルの行動変容が出現したマウス脳内のシナプスやストレス応答を鋭敏に捉える実験系を確立すべきであり、このような行動実験系の確立にも傾注した。行動解析の最適化としては、まずは統合失調症モデルマウスではなく、より糖化ストレスが鮮明に出現するマウスをモデルとして用いることが、確実な *in vivo* スクリーニングにつながると考えたため、糖化ストレス関連の精神疾患モデルマウスを用いた。アクティビティセンサーを用いた同一個体の活動量を縦断的に測定する実験系を新規に立ち上げ、これにより日々の活動量（尾懸垂試験などによる抑うつ症状と良い相関を示す）、食量（抑うつ状態では食量減少）、体重（抑うつ状態では減少）、糞中のコルチコステロン（抑うつ状態で上昇）、血中のサイトカイン（Bio-Plex 23）などを用いた多角的かつ縦断的な精神症状モデル評価実験系を確立した。従来の行動解析は横断的に1時点での行動を解析するものであるが、今回立ち上げた縦断的かつ多角的な精神疾患関連の行動を解析する手法は世界でも数例しか報告されておらず、今後、強力なツールとなる可能性がある。糖化スト

レスモデルマウスを行動解析し、in vivo 2光子励起イメージングにおいてシナプス動態を観察終了後は、モデルマウスから固定切片標本を作製し、終末糖化産物を免疫染色によりシナプスレベルの解像度で詳細に解析する予定だが、そのための脳切片での免疫染色法の条件検討も終了した。

#### 【今後の予定】

現時点で 1280 化合物のスクリーニングおよび解析終了し、幾つか良好な効果を有する化合物も見出されている。今後は、Hit validation のための一連の実験系行っていく。in vivo の実験に関しては、縦断的行動解析、in vivo 2光子励起イメージング、固定標本による免疫組織化学法を組み合わせ、個体レベルの表現型（行動解析）とシナプス病態（in vivo 2光子励起イメージング）および酸化・糖化・小胞体ストレス代謝産物（免疫組織化学）との結果を比較検討する。とりわけ in vivo 2光子励起イメージングで観察した神経細胞内におけるストレス代謝産物の細胞内局在を詳細に解析し、シナプトパッチと関連する代謝産物の蓄積の特徴を抽出する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawamura Atsuki, Katayama Yuta, Nishiyama Masaaki, Shoji Hirota, Tokuoka Kota, Ueta Yoshifumi, Miyata Mariko, Isa Tadashi, Miyakawa Tsuyoshi, Hayashi-Takagi Akiko, Nakayama Keiichi I	4. 巻 -
2. 論文標題 Oligodendrocyte dysfunction due to Chd8 mutation gives rise to behavioral deficits in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddaa036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohnishi, Balan, Toyoshima, Maekawa, Ohba, Watanabe, Iwayama, Fujita, Tan, Hisano, Shimamoto-Mitsuyama, Nozaki, Esaki, Nagaoka, Matsumoto, Hino, Mataga, Hayashi-Takagi, Hashimoto, Kunii, Kakita, Yabe, Yoshikawa	4. 巻 45
2. 論文標題 Investigation of betaine as a novel psychotherapeutic for schizophrenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 432 ~ 446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2019.05.062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 OBI-NAGATA Kisho, TEMMA Yusuke, HAYASHI-TAKAGI Akiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Synaptic functions and their disruption in schizophrenia: From clinical evidence to synaptic optogenetics in an animal model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 179 ~ 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.95.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 林（高木）朗子
2. 発表標題 精神病態シナプスバソロジーの多階層理解
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi-Takagi A
2. 発表標題 Multi-scale Understanding of Synaptic Pathology of Psychiatric Disorders
3. 学会等名 1st international symposium of multiscale brain (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林(高木)朗子
2. 発表標題 精神医学Update: 闇(座敷牢・癲狂院)を抜けて、そして光(光遺伝学)の方へ
3. 学会等名 Neuro2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi-Takagi A
2. 発表標題 Multi-scale Understanding of Synaptic Pathology of schizophrenia
3. 学会等名 JUSSCPR (日米脳) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi-Takagi A
2. 発表標題 Multi-scale Understanding of Synaptic Pathology of Psychiatric Disorders
3. 学会等名 生理研シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi-Takagi A
2. 発表標題 Multi-scale Understanding of Synaptic Pathology of Psychiatric Disorders
3. 学会等名 第10回武田科学振興財団薬科学シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関